

Pengaruh Durasi dan Konsentrasi Pelarut Ekstrak Etanol Daun Teh (*Camellia sinensis*) Menggunakan Metode Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli*

Thessarah Lia¹, Ismi Rahmawati^{2*}, Ghani Nurfiana Fadma Sari³

^{1,2,3}Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta, Indonesia.

*Email: ismirahmawati@setiabudi.ac.id

Abstract

Tea leaves (*Camellia sinensis*) are one of the plants that contain flavonoids, tannins, alkaloids, and secondary metabolites of catechins that have the potential as antibacterials. Extraction using the Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) method is influenced by the duration and concentration of the solvent. The purpose of this study was to determine the effect of different durations and solvent concentrations on the antibacterial activity of *Escherichia coli* tea extract using the UAE method. Tea leaves were extracted using the UAE method with sonication waves using 50%, 70%, and 96% ethanol solvents with a duration of 15, 30, and 45 minutes, as much as 25 grams in 250 ml. The extract was dissolved in 10% DMSO and an antibacterial activity test was carried out with a concentration of 75% as much as 50 μ L per well. The negative control in the bacterial activity test used 10% DMSO, and used ciprofloxacin as a positive control. The antibacterial activity test was determined using the well diffusion method to determine the diameter of the inhibition zone. The test results data were analyzed statistically using SPSS. The results showed that tea leaves have antibacterial activity against *Escherichia coli* bacteria, the resulting yield related to variations in solvent concentration and extraction duration did not differ significantly, however the results of the inhibition test against *Escherichia coli* bacteria showed significant differences. Tea leaf extract extracted with UAE with 70% ethanol for 30 minutes had the highest inhibition diameter resulting in antibacterial activity with an average value of $13.475\text{mm} \pm 0,38$.

Keywords: antibacterial; Ultrasonic Assisted Extraction (UAE); tea (*Camellia sinensis*); duration; Consentration of Ethanol.

Abstrak

Daun teh (*Camellia sinensis*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan flavonoid, tanin, alkaloid, dan metabolit sekunder katekin yang berpotensi sebagai antibakteri. Ekstaksi dengan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dipengaruhi oleh durasi dan konsentrasi pelarut. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh durasi dan konsentrasi pelarut yang berbeda terhadap aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ekstrak teh menggunakan metode UAE. Daun teh diekstraksi menggunakan metode UAE dengan gelombang sonikasi menggunakan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96% dengan durasi 15, 30, dan 45 menit, sebanyak 25 gram dalam 250 ml. Hasil ekstrak dilarutkan dengan DMSO 10% dan dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi 75% sebanyak 50 μ L setiap lubang. Kontrol negatif pada uji aktivitas bakteri menggunakan DMSO 10%, dan menggunakan ciprofloksasin sebagai kontrol positif. Uji aktivitas antibakteri yang dilakukan ditentukan menggunakan metode difusi sumuran untuk menentukan diameter zona hambat. Data hasil pengujian dianalisis secara statistik menggunakan SPSS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun teh memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, rendemen yang dihasilkan terkait variasi konsentrasi pelarut serta durasi ekstraksi tidak berbeda signifikan, akan tetapi hasil uji daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan perbedaan signifikan. Ekstrak daun teh yang diekstraksi dengan UAE dengan etanol 70% selama 30 menit

memiliki hasil diameter daya hambat tertinggi terhadap aktivitas antibakteri dengan nilai rata rata $13,475\text{mm} \pm 0,38$.

Kata Kunci: antibakteri; Ekstraksi Ultrasonik; daun teh; durasi; konsentrasi pelarut

1. PENDAHULUAN

World Health Organization (WHO) mencatat bahwa diare menjadi salah satu penyebab kematian pada anak-anak. Diare terjadi karena terjadinya infeksi pada saluran usus yang disebabkan oleh berbagai bakteri, virus, dan organisme parasit yang menyebar melalui makanan yang terkontaminasi, air minum, dan dari orang ke orang karena kebersihan yang kurang baik. Salah satu bakteri penyebab diare adalah *Escherichia coli* (*E. coli*) (WHO, 2024).

Patogen enterik, seperti *Shigella* spp., *Escherichia coli* penyebab diare, dan *Salmonella* spp., saat ini menunjukkan peningkatan resistensi yang pesat terhadap antibiotik yang tersedia. Sejak dahulu bahan alami dari tanaman obat, seperti rempah-rempah memiliki sifat antimikroba sehingga digunakan sebagai antibakteri secara turun-temurun untuk pengobatan. Banyak produk tumbuhan alami yang berpotensi sebagai antimikroba telah dikembangkan dan dapat digunakan baik secara sistemik maupun lokal. Para peneliti terdahulu telah membuktikan bahwa bahan alam juga berpotensi efektif sebagai antibakteri (Kamruzzaman *et al.*, 2013).

Daun teh merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri. Peneliti terdahulu telah membuktikan bahwa ekstrak daun teh mengandung senyawa alkaloid, saponin, steroid atau triterpenoid, flavonoid, polifenol, dan tanin (Endarini dan Mutiarawati, 2021).

Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan maserasi dan *Microwave Assisted Extraction* (MAE), metode UAE menghasilkan rendemen yang paling tinggi (Sari *et al.*, 2024). Gelombang ultrasonik bekerja dengan cara memecah lapisan dinding sel sampel sehingga zat – zat kimia dalam sampel lebih mudah ditarik oleh

pelarut (Marlina Kristina *et al.*, 2022). Konsentrasi pelarut serta durasi dalam proses ekstraksi menggunakan *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dapat mempengaruhi ekstraksi yang dihasilkan (Kumar *et al.*, 2021).

Daun teh memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*, proses ekstraksi dengan variasi pelarut etanol yang digunakan serta durasi dalam proses ekstraksi dapat mempengaruhi hasil ekstrak. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan pengkajian terhadap aktivitas antibakteri dengan variasi konsentrasi etanol 50%, 70%, 96% dan variasi durasi 15 menit, 30 menit dan 45 menit. Etanol 50% memiliki sifat yang paling polar diantara etanol 70% dan 96%, etanol 50% dapat menarik senyawa yang polar lebih banyak. Berbeda dengan etanol 96% memiliki senyawa yang non polar sehingga menarik senyawa non polar, sedangkan etanol 70% memiliki sifat seperti keduanya sehingga etanol 70% dapat menarik senyawa yang polar dan non polar. dan variasi durasi 15 menit, 30 menit dan 45 menit. Durasi waktu yang dibutuhkan pada saat ekstraksi menggunakan UAE juga perlu diperhatikan, karena durasi yang terlalu lama dapat menyebabkan senyawa dalam sampel mengalami oksidasi, dan jika terlalu sebentar menyebabkan senyawa yang tertarik tidak optimal.

2. METODE

2.1. Alat dan Bahan Alat untuk pembuatan ekstrak daun teh oven (*Memmert*) dengan suhu rendah dan konstan, grinding (*Ormismart GM-800S1*) untuk membuat serbuk, ayakan, alat ultrasonik (*Elmasonic*), gelas ukur (*Pyrex*), erlenmeyer (*Pyrex*), batang pengaduk, tabung reaksi (*Iwaki*), corong kaca (*Iwaki*), penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass (*Iwaki*),

cawan penguap, *waterbath* (Mettler), kertas saring, *Moisture Balance* (Ohaus), autoklaf (Allamerican), inkubator (Mettler), *Laminar Air Flow* (Airtech), jarum ose, lampu spiritus, korek api, pipet ukur (Pyrex), cawan petri (Pyrex), dan spuit (OneMed), mikroskop (Leica).

Bahan uji yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun teh dari Kemuning, Kecamatan Ngargoyoso, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah etanol 50%, 70%, 96% aquadestilata, DMSO, siprofloksasin, spiritus, CH_3COOH , H_2SO_4 , asetat anhidrida, larutan mayer, dragendroff, alkohol, asam klorida, amil alkohol, Natrium Agar, bakteri uji *Escherchia coli*.

2.2. Determinasi tanaman

Pada penelitian ini menggunakan daun teh (*Camellia sinensis* L.) dari perkebunan teh Kemuning, Kecamatan Ngargoyoso, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Pemetikan daun teh dengan cara mengambil pucuk meliputi satu kuncup dengan 2 sampai 3 daun pertama yang masih muda. Warna helaian daun berwarna hijau muda dan pertulangan daun menyirip dan bebas penyakit hama.

2.3 Preparasi dan Ekstraksi Daun Teh

Sampel daun teh yang sudah terkumpul dapat dipisahkan dari zat pengotor, dirajang lalu dikeringkan, setelah itu dilakukannya sortasi kering lalu disimpan dalam plastik atau wadah ditempatkan pada tempat yang kering. Simplisia yang sudah kering diblender untuk mendapatkan serbuk halus, setelah itu di ayak menggunakan ayakan mesh 40. Kemudian serbuk disimpan dalam wadah tertutup rapat dan letakkan di ruangan yang bebas dari cahaya matahari.

2.4 Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk daun teh dengan cara menimbang 2 gram serbuk daun teh. Penetapan susut pengeringan diukur menggunakan alat *Moisture Balance* yang dilakukan sebanyak 3 kali. Suhu diatur pada 105°C dan mulai mengukur susut pengeringan, ditunggu sampai alat berbunyi yang menandakan analisis susut pengeringan telah selesai (Kemenkes RI, 2017).

2.5 Penetapan kadar air

Penetapan kadar air menggunakan metode gravimetri dengan cara timbang sampel sebanyak 10 gram, masukan ke dalam wadah (kurs) yang telah ditara. Oven pada suhu 105°C selama 5 jam, dan timbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang tiap 1 jam sampai menunjukkan perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% dilakukan sebanyak 3 kali (Kemenkes RI, 2017).

2.6 Pembuatan Ekstrak etanol menggunakan metode Ultrasound Assisted Extraction

Ekstrak teh dibuat dengan cara mencampurkan bubuk teh dan pelarut etanol dengan perbandingan (1:10), 25 gram bubuk teh pada masing masing perlakuan dengan pelarut etanol 50%, 70%, dan 96% sebanyak 250 ml dan masing-masing diekstraksi selama 15 menit, 30 menit, dan 45 menit menggunakan suhu 45°C menggunakan ultrasonik bath yang menggunakan gelombang suara dengan frekuensi 37 kHz. Setelah dilakukan sonikasi pada sampel, filtrat dan ampas teh dipisahkan dengan menggunakan kertas saring Whatman, kemudian pelarut diuapkan dengan menggunakan *waterbath* sehingga terbentuk ekstrak kental the

2.7 Identifikasi kandungan kimia

1. Identifikasi flavonoid.

Pada identifikasi flavonoid menggunakan metode Sianidin/Shinoda/Shibata dengan cara 5 ml filtrat daun teh ditambahkan dengan magnesium, hidroklorida pekat, dan amil alkohol. Dikocok kuat dan dibiarkan memisah, hasil positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna jingga untuk flavon, merah sampai merah tua flavonol, merah tua sampai magenta atau merah keunguan flavanon (Shaikh dan Patil, 2020).

2. Identifikasi alkaloid.

3ml filtrat daun teh tambahkan dengan 1ml asam klorida 2N dan 9ml air, lalu panaskan selama 2 menit, di dinginkan lalu di saring. Pindahkan ke tiga tabung reaksi yang kosong dengan sama banyaknya. Pada tabung pertama ditambahkan dengan 1-2 tetes pereaksi Dragendorff positif alkaloid ditandai dengan berubah warna merah

kecoklatan, sedangkan pereaksi kedua ditambah dengan 1-2 tetes pereaksi Mayer positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya warna putih kekuningan (Minarno, 2015).

3. Identifikasi tanin.

Sebanyak 5 ml filtrat simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan besi (III) klorida. Hasil positif tanin ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi biru kehitaman (tanin galat) dan hijau kehitaman (tanin katekol) (Shaikh dan Patil, 2020)

2.8 Identifikasi tanin dengan Kromatografi Lapis Tipis.

Identifikasi tannin pada daun teh menggunakan pembanding tanin, fase gerak yang digunakan adalah toluen : aseton : asam format dengan perbandingan (5:4:1). Lakukan penotolan antara ekstrak dengan larutan pembanding dan setelah itu dideteksi pada sinar UV 254 (Kemenkes RI, 2017).

2.9 Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dapat dilakukan dengan dua cara. Cara pertama dengan menambahkan 1 ml asam asetat glasial dan 1 ml asam sulfat pekat pada ekstrak lalu dipanaskan. Jika tidak tercium bau ester atau bau buah-buahan, maka ekstrak tersebut sudah bebas etanol. Cara kedua dengan cara menambahkan 2 tetes asam sulfat pekat dan 1 ml kalium dikromat pada ekstrak setelah itu dilihat adanya perubahan warna. Jika tidak terjadi perubahan warna dari jingga menuju hijau kebiruan, maka ekstrak telah bebas etanol (Lenggu *et al.*, 2020)

2.10 Sterilisasi alat

Sterilisasi Alat-alat dari kaca seperti gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 160-180°C selama 30-60 menit. Alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung dan inkas disterilkan dengan menggunakan formalin. Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit (Depkes RI, 1995).

2.11 Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara menanam bakteri *E. coli* dalam cawan petri yang berisi media NA steril.

Mikroorganisme atau kultur bakteri digoreskan ke permukaan medium padat menggunakan jarum ose pada medium yang telah tersedia, proses peremajaan bakteri dilakukan di dalam LAF atau inkas untuk menghindari kontaminasi. Hasil peremajaan kemudian diinkubasi selama 24-48 jam di dalam inkubator (Oktavia dan Pujiyanto, 2018)

2.12 Identifikasi makroskopis *Escherichia coli*

Pembuatan suspensi bakteri uji *E. coli* dengan cara, ambil bakteri dengan jarum ose lalu bakteri di streak pada media Endo Agar (EA) dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil dinyatakan positif apabila bakteri tersebut membentuk koloni merah metalik (Alouw *et al.*, 2022)

2.13 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram

Teknik pewarnaan Gram dilakukan dengan membersihkan objek glass terlebih dahulu menggunakan alkohol 95% dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen sehingga bebas dari kotoran lalu tunggu sampai dingin. Pewarnaan ini dilakukan dengan membuat preparat ulas (smear) dan panaskan sebentar diatas lampu spiritus, lalu teteskan kristal violet pada gelas objek sampai menutupi seluruh sediaan, didiamkan selama kurang lebih 60 detik pada suhu ruangan, setelah itu di cuci secara perlahan dengan aquadestilata selama 5 detik atau air mengalir lalu dikeringkan. Pada objek glass akan membentuk warna biru, lalu ditambahkan larutan lugol dan diamkan selama 1-2 menit, setelah itu objek glass di cuci dengan air mengalir atau aquades selama 5 detik. Dekolorisasi dilakukan dengan cara membilas objek glass dengan alkohol 95% dan bilas dengan air mengalir untuk menghentikan proses dekolorisasi. Objek glass yang telah mengalami dekolorisasi ditetesi safranin dan didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir atau aquadestilata selama 5 detik dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kemudian diamati dibawah mikroskop untuk melihat bentuk bakteri terhadap zat warna. Jika bakteri berwarna ungu menandakan bakteri tersebut adalah bakteri

gram negatif, jika berwarna merah tersebut menandakan bakteri gram positif.

2.14 Identifikasi *Escherichia coli* dengan uji biokimia

1. SIM (*Sulfide Indol Motility*).

Biakan bakteri ditanamkan pada media SIM dengan ditusuk dengan jarum ose kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Setelah diinkubasi ditambahkan dengan reagen Kovacs, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media (Cooper, 2019)

2. KIA (*Kliger Iron Agar*).

Biakan bakteri diinokulasikan dengan cara ditusukkan jarum ose secara tegak dan digoreskan pada bagian miring media KIA. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3. LIA (*Lysine Iron Agar*)

Inokulasikan biakan bakteri ke dalam media LIA (Lysine Iron Agar) dengan cara menggores pada agar miring (slant) dan menusuk agar tegak (butt). Masukkan kedalam inkubator selama 24-48 jam pada suhu 35°C (Ayu *et al.*, 2021)

4. Citrat

Bakteri diambil menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan, setelah itu tusukkan dan gosserkan pada media CSA lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Safitri *et al.*, 2019)

2.15 Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu suspensikan bakteri tersebut kedalam NaCl 5 ml. Aduk hingga homogen menggunakan vorteks sampai mendapatkan kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5 (Mpila *et al.*, 2012).

2.16 Pengujian aktivitas antibakteri *Escherichia coli* metode difusi

Efek antibakteri dari ekstrak daun teh diuji secara mikrobiologi dengan bakteri *E. coli*. Pengujian bakteri ini menggunakan metode difusi sumuran. Metode difusi sumuran digunakan untuk mengukur zona hambat bakteri. Pada lubang sumuran ditetesi kontrol positif ciprofloksasin 500mg sebanyak 50µl, DMSO 10% sebanyak 50µl sebagai kontrol negatif karena DMSO 10% merupakan pengemulsi yang tidak memiliki aktivitas antibakteri

dan kelompok perlakuan ekstrak etanol 50%, 70%, dan 96% daun teh dengan konsentrasi 75% masing-masing sebanyak 50 µl. Metode difusi dilakukan dengan cara menginkubasi cawan petri ke dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 1x24 jam dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan mistar berskala. Hambatnya adalah 0 mm. Kemudian dikategorikan penggolongannya berdasarkan kekuatan daya antibakterinya (Alouw *et al.*, 2022)

2.17 Analisis Hasil

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 50%, 70%, 96% dengan durasi 15, 30, 45 menit pada masing-masing konsentrasi etanol daun teh terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode sumuran yang dinyatakan dengan diameter zona hambat (zona bening) yang terbentuk di sekitar cakram di analisis secara statistik dengan SPSS menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Data dinyatakan terdistribusi normal bila nilai $p > 0,05$ dan apabila $p < 0,05$ menunjukkan distribusi tidak normal. Data normal dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA*, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal-Wallis*

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil determinasi

Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta menyatakan bahwa sampel uji memiliki nama ilmiah (*Camellia sinensis*). Pada pembuatan serbuk, rendemen yang dihasilkan adalah 48,94%. Hasil rendemen serbuk daun teh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil rendemen serbuk daun teh

Bobot simplisia (Kg)	Bobot serbuk (Kg)	Rendemen (%)
0,85	0,416	48,94%

3.2. Hasil Uji susut pengeringan

Tujuan dari dilakukannya uji susut pengeringan untuk mengetahui besarnya

senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan. Berdasarkan pengujian yang dilakukan didapatkan hasil rata-rata dari ketiga replikasi susut pengeringan serbuk

Pada pengujian susut pengeringan menunjukkan bahwa nilai rata-rata susut pengeringan daun teh 4,33% Rata-rata susut pengeringan memenuhi persyaratan dari Farmakope Herbal Indonesia edisi 2, dikarenakan kurang dari 10% (Kemenkes RI, 2017). Hasil uji susut pengeringan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji susut pengeringan

Serbuk (g)	Susut Pengeringan (%)	Rata-rata $\pm$ SD
2,00	4,5	4,33% $\pm$ 0,288
2,00	4,5	
2,00	4	

3.3 Hasil uji kadar air serbuk daun teh

Nilai kadar air yang melebihi persyaratan dapat menyebabkan kerusakan pada serbuk yang dikarenakan akan terjadinya proses fermentasi jamur dan adanya mikroba yang mengakibatkan kerusakan pada serbuk sehingga kurangnya daya tahan dalam masa penyimpanan serbuk. Hasil rata-rata kadar air serbuk daun teh 3,167%, hal tersebut memenuhi persyaratan dikarenakan hasil kadar air kurang dari 8% (Badan Standarisasi Indonesia, 2016). Hasil uji kadar air serbuk daun teh dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji kadar air serbuk daun teh

No	Bobot awal serbuk (gram)	Bobot akhir serbuk	Kadar air serbuk (%)
1.	10,0214	9,7247	2,9
2.	10,0244	9,7778	2,4
3.	10,0605	9,628	4,2
Rata-rata $\pm$ SD		3,167 $\pm$ 0,93	

3.4 Hasil Ekstraksi menggunakan metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE)

Ekstraksi serbuk daun teh dilakukan dengan metode ultrasonik. Proses ekstraksi metode ultrasonik dilakukan dengan getaran gelombang ultrasonik, menggunakan frekuensi 37 kHz dengan

suhu 45°C, pelarut yang digunakan pada metode ultrasonik ini ialah 50%, 70%, dan 96% sebanyak 250 mL dengan 25 g serbuk daun teh dan menggunakan durasi waktu selama 15, 30, 45 menit pada masing-masing pelarut. Nilai rendemen yang dihasilkan memenuhi persyaratan karena lebih dari 7,8% sesuai dengan standart Farmakope Herbal Indonesia edisi 2 (Kemenkes RI, 2017). Hasil ekstraksi menggunakan metode UAE dapat dilihat pada Tabel 4.

Perbedaan konsentrasi pelarut dalam ekstraksi menggunakan UAE menunjukkan hasil rendemen yang berbeda. Ekstraksi menggunakan UAE dengan etanol 70% didapatkan hasil sebanyak 22,86% dan mengalami penurunan pada saat menggunakan etanol 80% dan 90% pada daun gonda (Hartanti *et al.*, 2021). Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan perbedaan rendemen dipengaruhi konsentrasi pelarut.

Jumlah rendemen yang dihasilkan lebih banyak jika dibandingkan Farmakope Herbal Indonesia karena gelombang ultrasonik pada alat UAE merupakan microactivity yang dapat meningkatkan penetrasi menuju dinding sel menggunakan prinsip kavitasi untuk merusak dinding sel dan dapat melepas komponen sel lebih mudah, sehingga dapat mempersingkat waktu dan mengoptimalkan penggunaan pelarut untuk mendapatkan senyawa yang optimal (Kristina *et al.*, 2022).

Tabel 4. Hasil ekstraksi menggunakan metode UAE

Sampel Konsentrasi	Durasi	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
50%	15	4,000	16,000
	30	4,327	17,308
	45	4,920	19,680
70%	15	4,472	17,888
	30	5,704	22,816
	45	5,121	20,484
96%	15	4,753	19,012
	30	5,142	20,568
	45	5,000	20,000

3.5 Hasil Uji Fitokimia

Skrining fitokimia adalah tahap pendahuluan yang merupakan suatu metode yang harus dilakukan untuk mengetahui

informasi atau gambaran tentang golongan senyawa. Tujuan dari adanya identifikasi ialah untuk mengetahui kualitas dari bahan alam yang digunakan. Pada uji skrining fitokimia flavonoid menggunakan metode uji shinoda, dilakukannya penambahan Mg dan HCl yang berfungsi untuk mereduksi benzopiron sehingga menghasilkan garam flavilium yang berwarna jingga atau kemerahan.

Pengujian skrining fitokimia alkaloid menggunakan 2 pereaksi yaitu Mayer dan Dragendorff, pada sampel yang ditetesi Mayer pada bagian bawah terdapat endapan berwarna putih yang berasal dari kalium tetraiodomercurat (II) dari Mayer yang dapat membentuk endapan kompleks kalium alkaloid. Sementara itu pada sampel yang ditetesi dengan Dragendorff terdapat endapan berwarna coklat kemerahan dengan larutan yang berwarna jingga dari ion logam K⁺ membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid (David *et al.*, 2024)

Filtrat pada daun teh juga menunjukkan terdapat adanya tanin, pada pengujian tanin menghasilkan warna hijau kehitaman yang berarti daun teh positif mengandung tanin, pada saat penambahan FeCl₃ terdapat reaksi dengan gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin (Syaron *et al.*, 2020). Hasil yang telah didapatkan menunjukkan bahwa filtrat daun teh memiliki kandungan flavonoid, alkaloid dan tanin pada ketiga konsentrasi etanol. Hasil uji fitokimia filtrat daun teh dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji fitokimia filtrat daun teh

Sampel	Senyawa	Pereaksi	Ket
Etanol 50%	Flavonoid	Sianidin	+
	Alkaloid	Mayer	+
	Tanin	Dragendorff	+
Etanol 70%	Flavonoid	FeCl ₃	+
	Alkaloid	Sianidin	+
	Tanin	Mayer	+
Etanol 96%	Flavonoid	Dragendorff	+
	Alkaloid	FeCl ₃	+
	Tanin	Sianidin	+

Keterangan:

-: Tidak teridentifikasi

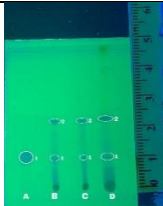
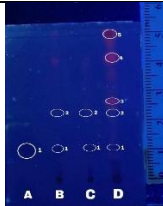
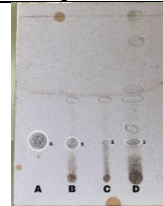
+: Teridentifikasi

3.6 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis ekstrak daun teh dengan metode UAE

Kromatografi lapis tipis (*Thin-layer chromatography*/TLC) adalah teknik kromatografi yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa dalam ekstrak. Fase gerak pada KLT menggunakan toluen:aseton:asam format (5:4:1). Senyawa katekin dari tanin dielusi menggunakan fase gerak dan baku yang digunakan adalah baku asam galat. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut terdapat bercak, kemudian bercak tersebut diamati pada UV 254 menggunakan peredaman berfluoresensi coklat. Bercak lalu disemprot menggunakan FeCl₃ kemudian di panaskan selama 10 menit dengan suhu 100°C, setelah dipanaskan menghasilkan adanya bercak berwarna coklat dan kontrol positif berwarna abu-abu pada sinar tampak menunjukkan bahwa sampel mengandung fenol (Rusmawijayanto *et al.*, 2019). Baku pembanding asam galat memiliki nilai R_f (A) 0,22 cm, sampel B, C, dan D memiliki nilai R_f yang sama dengan baku pembanding. Nilai R_f ekstrak daun teh dapat dilihat pada Tabel 7.

Pada pengujian KLT pemilihan fase gerak berdasarkan Farmakope Herbal Edisi 2 pada pengujian KLT terhadap baku katekin (Kemenkes RI, 2017). Senyawa yang tertarik pada etanol 96% lebih banyak jika dibandingkan dengan etanol 50% dan 70%, ditunjukan dengan adanya 4 bercak pada lempeng KLT yang nampak pada UV 366nm. Lempeng KLT memiliki sifat polar, sedangkan senyawa metabolit sekunder yang tertarik oleh etanol 96% bersifat non polar, sehingga hal tersebut menghasilkan bercak yang tampak pada lempeng. Hasil Uji KLT dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji KLT

UV 254	UV 366	Sinar tampak
		

Keterangan:

A = Baku asam galat

B = Ekstrak daun teh dengan larutan etanol 50% selama 30 menit

C = Ekstrak daun teh dengan larutan etanol 70% selama 30 menit

D = Ekstrak daun teh dengan larutan etanol 96% selama 30 menit

Tabel 7. Nilai Rf Ekstrak daun teh

UV 254	UV 366	Sinar tampak disemprot FeCl ₃
A ₁ = 0,22	A ₁ = 0,22	A ₁ = 0,22
B ₁ = 0,22	B ₁ = 0,22	B ₁ = 0,22
B ₂ = 0,50	B ₂ = 0,50	C ₁ = 0,22
C ₁ = 0,22	C ₁ = 0,22	D ₁ = 0,22
C ₂ = 0,50	C ₂ = 0,50	
D ₁ = 0,22	D ₁ = 0,22	
D ₂ = 0,50	D ₂ = 0,50	
	D ₃ = 0,54	
	D ₄ = 0,84	
	D ₅ = 1	

3.7 Hasil uji bebas etanol

Identifikasi etanol dilakukan untuk membuktikan bahwa ekstrak daun teh yang diujikan sebagai antibakteri tidak terdapat etanol, etanol yang masih tertinggal dalam ekstrak dapat menyebabkan hasil yang bias terhadap aktivitas antibakteri. Hasil uji bebas etanol dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Uji bebas etanol ekstrak daun teh

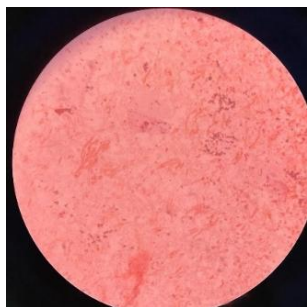
Prosedur	Hasil	Kesimpulan
Ekstrak daun teh + CH ₃ COOH + H ₂ SO ₄	Tidak berbau Ester	Bebas Etanol

3.8 Identifikasi Bakteri *E. coli* pada media EA

Hasil uji identifikasi *E. coli* menggunakan media Endo agar menghasilkan warna merah metalik pada bakteri. Identifikasi makroskopis bertujuan untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada warna dan bentuk koloni bakteri secara visual. Proses uji dilakukan dengan inkubasi pada media EA (Endo Agar) pada cawan petri yang sudah terdapat bakteri *E. coli*. Warna merah metalik yang dihasilkan dikarenakan bakteri *E. coli* dengan koliformer memetabolis laktosa menjadi aldehyd dan asam sehingga aldehyd bereaksi dengan indikator fuschin dan membentuk senyawa kompleks (Alouw *et al.*, 2022). Hasil uji identifikasi bakteri *E. coli* pada media EA dapat dilihat pada Gambar 1.

**Gambar 1. Bakteri *E. coli* pada media Endo Agar****3.9 Hasil Identifikasi *E. coli* pada Pewarnaan Gram**

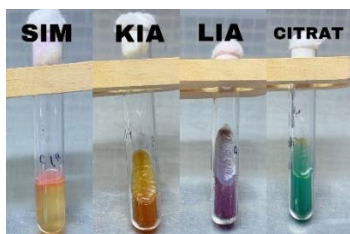
Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis jika dibandingkan dengan bakteri Gram positif, bakteri gram negatif juga memiliki membran luar yang mengandung lipopolisakarida. Pada proses pewarnaan kristal violet semua bakteri akan berwarna ungu, Gram B berperan sebagai mordant yang membentuk kompleks kristal violet yang terperangkap dalam lapisan peptidoglikan, ketika ditetesi alkohol atau aseton maka akan melarutkan membran luar bakteri Gram negatif dan membersihkan kristal violet dan menyebabkan lunturnya warna ungu. Safranin yang akan mewarnai bakteri Gram negatif menjadi warna merah (Bria *et al.*, 2022). Hasil pewarnaan gram bakteri *E. coli* tersaji pada Gambar 2.



Gambar 2. Pewarnaan Gram bakteri *E. coli*

3.10 Hasil pengujian biokimia

Hasil pengujian biokimia sangat penting untuk mengidentifikasi mikroorganisme dan menentukan kemampuan bakteri dalam melakukan reaksi biokimia tertentu, seperti fermentasi gula, produksi enzim, dan toleransi terhadap zat tertentu. Hasil uji biokimia bakteri *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji biokimia bakteri *E. coli*

Pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°. Hasil uji biokimia bakteri *E. coli* dapat disimpulkan pada Tabel 9.

Tabel 9. Kesimpulan uji biokimia bakteri *E. coli*

Media	Kesimpulan
SIM	+++
KIA	A/A S- G-
LIAC	K/K S- G+
Citrat	-

Pada media SIM, KIA, LIA dan citrat menunjukkan bahwa sampel tersebut merupakan bakteri tersebut ialah bakteri *E. coli*. Pada media SIM menunjukkan +++ yang berarti tidak adanya warna hitam pada bakteri yang menunjukkan tidak adanya sulfida pada bakteri, namun terdapat indol pada bakteri uji setelah ditetesi reagen kovalsch, dan terdapat motilitas bakteri yang

artinya terdapat pergerakan bakteri pada media. Bakteri *E. coli* pada media KIA menghasilkan warna A/A yang berarti berwarna kuning pada bagian permukaan atas dan bawah media, hal tersebut dikarenakan memiliki kemampuan untuk memfermentasi glukosa (Sari, 2013). Pada media tidak memiliki ruang kosong atau gas H₂S dan tidak terdapat sulfida ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam.

Pada media LIA menghasilkan K/K atau menghasilkan warna ungu dari permukaan atas sampai bawah disebabkan karena adanya perubahan pH bromocresol menjadi warna ungu, hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri mampu mendekarboksilasi lysin dan menghasilkan amin kadeverin (Wardani dan Tanikolan, 2021). Pada bagian bawah terdapat gas yang, dan tidak terdapat sulfida karena tidak adanya warna hitam pada media. Pengujian menggunakan citrat menghasilkan warna hijau yang berarti negatif karena tidak ada perubahan warna pada media yang berarti bakteri *E. coli* tidak memanfaatkan citrat sebagai sumber karbon (Safitri *et al.*, 2019).

3.11 Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun teh dengan metode UAE

Difusi sumuran menjadi metode yang dipilih dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun teh, terdapat perbedaan pengaruh perlakuan yang diberikan terhadap bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa antara kontrol positif dengan 9 sampel ekstrak daun teh terdapat aktivitas antibakteri yang berbeda-beda terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*. Diameter terbesar yaitu pada ekstrak daun teh yang dilarutkan dengan etanol 70% dengan durasi 30 menit, dan diameter yang terkecil pada konsentrasi ekstrak daun teh yang dilarutkan menggunakan etanol 50% selama 15 menit. Hal tersebut dikarenakan zat yang bersifat antibakteri tidak tertarik maksimal pada etanol 50% dan sedikit tertarik pada etanol 96%, dan optimal tertarik pada etanol 70%. Diameter daya hambat ekstrak daun teh yang di ekstraksi menggunakan UAE dengan metode difusi sumuran dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Diameter daya hambat ekstrak daun teh yang di ekstraksi menggunakan UAE dengan metode difusi sumuran.

Sampel (Etanol, durasi)	Rata-rata (mm) $\pm$ SD	Ket
50%,15	9,27 $\pm$ 0,20	S
50%,30	9,82 $\pm$ 0,80	S
50%,45	11,04 $\pm$ 0,60	K
70%,15	11,12 $\pm$ 0,66	K
70%,30	13,47 $\pm$ 0,38	K
70%,45	12,41 $\pm$ 0,48	K
96%,15	11,33 $\pm$ 0,40	K
96%,30	12,63 $\pm$ 0,32	K
96%,45	12,09 $\pm$ 0,43	K
K+ (5 μ g)	35,98 $\pm$ 0,47	SK
K- DMSO 10%	0 $\pm$ 0	T

Keterangan:

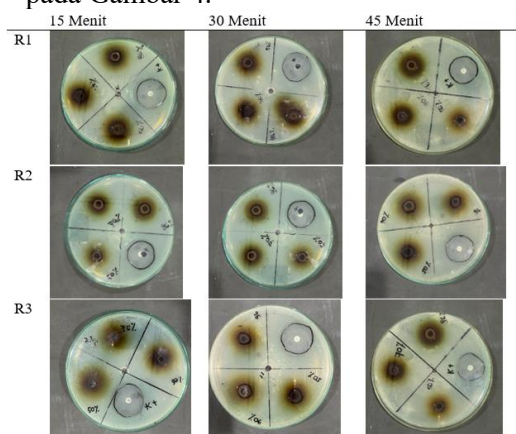
S: Sedang

K: Kuat

SK: Sangat Kuat

T: Tidak ada

Pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 24 jam, menghasilkan zona bening pada sekitar lubang sumuran yang dapat dinyatakan sebagai daya hambat. Hasil uji aktivitas antibakteri yang diekstraksi menggunakan metode UAE dengan metode difusi sumuran dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Uji aktivitas antibakteri yang diekstraksi menggunakan metode UAE dengan metode difusi sumuran

Setelah didapatkan daya hambat dari daun teh, hasil uji aktivitas antibakteri

ekstrak daun teh dianalisis menggunakan program SPSS. Uji diawali dengan mengetahui nilai normalitas rata-rata diameter menggunakan uji Shapiro wilk. Hasil uji normalitas antibakteri ekstrak daun teh diperoleh sig >0,05 maka disimpulkan data tersebut terdistribusi secara normal. Uji dilanjutkan dengan uji homogenitas. Hasil uji homogenitas menunjukan pada nilai sig >0,05 maka varian data bersifat homogen, maka uji homogenitas terpenuhi terdapat perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif dan kontrol positif. Pada pengujian dilanjut dengan pengujian menggunakan *One Way Anova* dan diikuti dengan uji *Post Hoc Tukey's* sehingga didapatkan hasil pada etanol 96% dan 70% yang diekstraksi selama 45 menit dan 30 menit berada pada subset yang sama dan memiliki hasil aktivitas antibakteri yang terbaik, namun tidak sebanding dengan kontrol positif dikarenakan hanya mendekati subset kontrol positif tetapi tidak berada dalam 1 subset dengan kontrol positif siprofloksasin 5 μ g. Hasil statistik antibakteri ekstrak daun teh dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil statistik aktivitas antibakteri ekstrak daun teh

KHM

Tukey HSD^a

		Subset for alpha = 0.05					
Sampel	N	1	2	3	4	5	6
K-	3	.000 ^a					
50,15	3		9.267 ^b				
50,30	3		9.820 ^b	9.820 ^b			
50,45	3			11.04 ^b	11.040 ^b		
70,15	3			11.12 ^b	11.123 ^b		
96,15	3			11.333 ^b	11.333 ^b		
96,45	3				12.087 ^b	12.087 ^b	
70,45	3				12.417 ^b	12.417 ^b	
96,30	3				12.630 ^b	12.630 ^b	
70,30	3					13.475 ^b	
K+ (5 μ l)	3						35.983 ^b
Sig.		1.000	.978	.101	.073	.166	1.000

Keterangan:

a: Tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif

b: Tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif

Pada pelarut polar terdapat senyawa polar yang tertarik seperti flavonoid, tanin, alkaloid. Flavonoid bekerja dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel serta menghambat metabolisme energi. Dalam menghambat sintesis asam nukleat, cincin A dan B senyawa flavonoid berperan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen yakni dengan menumpuk basa asam nukleat sehingga menghambat pembentukan DNA dan RNA, dan juga menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel. Dalam menghambat fungsi membran sel flavonoid akan membentuk senyawa kompleks dari protein ekstraseluler dan terlarut sehingga membran sel akan rusak dan senyawa intraseluler akan keluar. Sedangkan dalam menghambat metabolisme energi dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri, yaitu dengan mencegah pembentukan energi pada membrane sitoplasma dan menghambat motilitas bakteri yang berperan dalam aktivitas antimikroba dan protein ekstraseluler (Harms *et al.*, 2024)

Alkaloid bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri melalui induksi penghancuran komponen dinding sel bakteri, alkaloid juga dapat mengganggu sintesa asam nukleat pada bakteri. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri melalui penghambatan reverse transcriptase dan DNA topoisomerase enzim sehingga dapat menekan proses replikasi bakteri. Tanin juga dapat menginduksi inaktivasi adhesi, transport protein dan kapsul sel serta mengikat ion besi yang menyebabkan ketersediaan besi berkurang, akibatnya dapat mengganggu metabolisme bakteri (Berlina *et al.*, 2023)

Etanol 96% bersifat non polar, maka lebih banyak senyawa non polar yang tertarik dalam etanol 96%. Daun teh memiliki senyawa non polar seperti steroid dan terpenoid (Endarini, 2021). Terpenoid bekerja dengan cara meningkatkan permeabilitas sel menyebabkan terjadinya kebocoran sel yang diikuti keluarnya material intraseluler (Nurjannah *et al.*, 2022).

4 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa rendemen daun teh dengan variasi konsentrasi etanol dengan waktu yang dihasilkan tidak berbeda signifikan, namun berbeda signifikan terhadap aktivitas antibakteri. Variasi ekstrak daun teh yang diekstraksi dengan etanol 70% selama 30 menit memiliki diameter zona hambat yang tertinggi dengan rata-rata 13,47 mm.

REFERENSI

- Alouw, G., Fatimawali, F. And Lebang, J. S. (2022) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan Metode Difusi Sumuran', *Jurnal Farmasi Medica/Pharmacy Medical Journal (Pmj)*, 5(1), p. 36. doi: 10.35799/pmj.v5i1.41430.
- Ayu, ., Ramli, M. And Abidin, L. O. B. (2021) 'Karakterisasi Biokimia Dan Identifikasi Isolat Bakteri Pada *Makroalga padina* Australis Dari Perairan Pantai Tanjung Tiram', *Jurnal Sapa Laut (Jurnal Ilmu Kelautan)*, 6(1), p. 11. doi: 10.33772/jsl.v6i1.17551.
- Badan Standarisasi Indonesia (2016) 'Teh Hijau', *SNI 3945:2016*.
- Bria, D. I., Missa, H. And Sombo, I. T. (2022) 'Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Escherichia coli* Pada Bahan Pangan Berbasis Daging Di Kota Kupang Pendahuluan Berdasarkan Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 1996 Tentang Pangan Dan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004', *Jurnal Sains Dan Terapan*, 1(2), Pp. 82–89.
- Chester R. Cooper, J. (2019) 'Sulfide Indole Motility (SIM) Test', *Microbiology Laboratory (Biol*

- 37021), Pp. 1–5.
- David, A. Prayoga, D. K. Hisan, A.K. (2024) ‘Uji Kandungan Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae*) Sebagai Kandidat Zat Aktif Sunscreen’, 7(1), pp. 10–17.
- Depkes Ri (1995) *Farmakope Indonesia Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia*.
- Endarini, L. H. (2021) ‘Rendemen Dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* L) Lully’, 2-Trik: Tunas-Tunas Riset Kesehatan, 11(2), Pp. 113–115.
- Endarini, L. H. And Mutiarawati, D. T. (2021) ‘Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*’, *Tunas-Tunas Riset Kesehatan*, 11(3), Pp. 176–179. Available At: <http://2trik.jurnalelektronik.com/index.php/2trik/article/view/695>.
- Harms, C. D. C., Activity, A. And Harms, C. D. C. (2024) ‘Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Kulit Batang *Chisocheton sp.*’, 17(1), pp. 87–96.
- Hartanti, A. I., Permana, I. D. G. M. And Puspawati, K. D. (2021) ‘Pengaruh Konsentrasi Etanol Pada Metode Ultrasonikasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Gonda (*Sphenoclea zeylanica*)’, *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 10(2), pp. 163–171.
- Kamruzzaman, M., Bari, S. M. N. And Faruque, S. M. (2013) ‘In Vitro And In Vivo Bactericidal Activity Of Vitex Negundo Leaf Extract Against Diverse Multidrug Resistant Enteric Bacterial Pathogens’, *Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine*, 6(5), Pp. 352–359. doi: 10.1016/s1995-7645(13)60038-3.
- Kemenkes RI (2017) *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*.
- Kumar, K., Srivastav, S. And Sharanagat, V. S. (2021) ‘Ultrasound Assisted Extraction (UAE) Of Bioactive Compounds From Fruit And Vegetable Processing By-Products: A Review’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 70(September 2020), p. 105325. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325.
- Lenggu, C. K. L., Rini, D. I. And Shinta, A. L. (2020) ‘Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Daging Buah Lontar (*Borassus flabellifer* Linn) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Secara In Virto’, *Cendana Medical Journal (Cmj)*, 19(1), pp. 96–107.
- Marlina Kristina, C. V., Ari Yusasrini, N. L. And Yusa, N. M. (2022) ‘Pengaruh Waktu Ekstraksi Dengan Menggunakan Metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Duwet (*Syzygium cumini*)’, *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (Itepa)*, 11(1), p. 13. doi: 10.24843/itepa.2022.v11.i01.p02.
- Minarno, B. (2015) ‘Skrining Fitokimia Dan Kandungan Total Flavanoid Pada Buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch Di Kawasan Bromo, Cangar, Dan Dataran Tinggi Dieng’, *Jurusan Biologi Fakultas Saintek, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*, 5. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.167.
- Mpila, D. ., Fatimawali And Wiyono, W. I. (2012) ‘Uji Aktivitas Antibakteri Daun Mayana (*Coleus Atropurpureus* [L] Benth) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Dan *Pseudomonas Aeruginosa* Secara In-Vitro’, *Uji Aktivitas Antibakteri Daun Mayana*

- (*Coleus atropurpureus* [L] Benth) Terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* Secara In-Vitro, P. 13.
- Nurjannah, I., Mustariani, B. A. A. and Suryani, N. (2022) 'Skrining Fitokimia Dan Uji Antibakteri Ekstrak Kombinasi Daun Jeruk Purut (*Citrus hiystris*) Dan Kelor (*Moringa oleifera* L.) Sebagai Zat', *Jurnal Kimia & Pendidikan Kimia*, 4(100), pp. 23–36. doi: 10.20414/spin.v4i1.4801.
- Oktavia, N. And Pujiyanto, S. (2018) 'Isolasi Dan Uji Antagonisme Bakteri Endofit Tapak Dara (*Catharanthus roseus*, L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*, *J. Berkala Bioteknologi*, 1(1), Pp. 6–12.
- Purnama Sari, I., Ulvia, R. And Putra Pratama, N. (2024) 'Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Flavonoid Total (*Citrus aurantifolia*)', *Jurnal Ilmiah Farmasi Attamru*, 5(2), Pp. 100–113. Available At: <https://Journal.Uim.Ac.Id/Index.Php/Attamru>.
- Ro Berlina, A. Y., Lumbangaol, N. Y. And Simanjuntak, H. A. (2023) 'Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) Terhadap *Staphylococcus aureus*', *Herbal Medicine Journal*, 6(1), pp. 15–20. doi: 10.58996/hmj.v6i1.77.
- Rusmawijayanto, T., Luliana, S. And Isnindar (2019) 'Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) Metode Perkolasi', *Farmasi Kalbar Universitas Tanjungpura*, 4(1).
- Safitri, E., Hidayati, N. A. And Hertati, R. (2019) 'Prevalensi Bakteri *Salmonella* Pada Ayam Potong Yang Dijual Di Pasar Tradisional Pangkalpinang', *Ekotonia: Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi Dan Mikrobiologi*, 4(1), pp. 25–30. doi: 10.33019/ekotonia.v4i1.1012.
- Sari, D. (2013) Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* L) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Dan *Klebsiella pneumoniae* Beserta Bioautografinya.
- Shaikh, J. R. And Patil, M. (2020) 'Qualitative Tests For Preliminary Phytochemical Screening: An Overview', *International Journal Of Chemical Studies*, 8(2), pp. 603–608. doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834.
- Syaron, P. Sientje, M. Irma, L. (2020) 'Uji Senyawa Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)', 9(2), Pp. 64–69.
- Wardani, T. S. And Tanikolan, R. A. (2021) 'Analisis Cemarkan Bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella* Pada Depot Amiu Kelurahan Cemani Kabupaten Sukoharjo', *Seminar Informasi Kesehatan Nasional*, Pp. 148–157. Available At: <https://medicra.umsida.ac.id/index.php>.
- Who (2024) *Diarrhoeal Disease*, WHO. Available At: <https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/diarrhoeal-disease>.